Aus der I. Inneren Abteilung des
Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
Ärztl. Direktor: Professor Dr. med. Klaus Holldack

PODOPHYLLINEINWIRKUNG AUF DIE PROLIFERATIONSKINETIK VON MENSCHLICHEM KNOCHENMARK IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lenzner, Wolfgang
aus Marburg/Lahn

1968

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus der I. Inneren Abteilung des
Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
Ärztl. Direktor: Professor Dr. med. Klaus Holldack

PODOPHYLLINEINWIRKUNG AUF DIE PROLIFERATIONSKINETIK VON MENSCHLICHEM KNOCHENMARK IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lenzner, Wolfgang
aus Marburg/Lahn

Dekan:	Professor Dr. med. Hans Wolfgang Spier
Referent:	Priv. Doz. Dr. med. Irene Boll
Korreferent:	Professor Dr. med. Dr. sc. h. c. Dr. med. vet. h. c. Dr. med. h. c. Hans Freiherr v. Kreß

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 31. Mai 1968

Diese Arbeit ist

meiner Frau Ina, geb. Schran, gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552705_0014

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	7
II.	Fragestellung	8
III.	Allgemeine Grundlagen	8
IV.	Material und Methoden	9
	A) Anfertigung der Kulturen	9
	B) Zählung und Auswertung	10
	C) Beschreibung der gezählten Zellen des erythrocyto- und granulocyto-poetischen Systems	11
	D) Differenzierung der Mitosephasen	13
	E) Die Fälle	15
V.	Ergebnisse	15
	A) Verhalten der Mitoseindices	15
	B) Die Karyologischen Kurven	19
	C) Die Reifungskurven	21
VI.	Zusammenfassung der Ergebnisse	25
VII.	Diskussion der Ergebnisse	26
VIII.	Zusammenfassung	30
Literatur		31
Lebenslauf		

I. Einleitung

Der Wirkstoff des SP-I ist das Äthylhydrazid der Podophyllinsäure. Es stellt eine Fraktion des Harzextraktes aus Podophyllum dar (EMMENEGGER, STÄHELIN, RUTSCHMANN, RENZ, v. WARTBURG). Diese Pflanzengattung gehört zu den Berberidaceen und kommt als Podophyllum emodi Wall. im Himalaya und als Podophyllum peltatum L. in Nordamerika vor. Schon vor Jahrhunderten benutzten es die nordamerikanischen Indianer als Emeticum, Anthelminticum und lokal als Antidot bei Mückenstichen.

Aber erst 1947 entdeckten SULLIVAN und WECHSLER die Wirkung von Podophyllin auf die Zellteilung. Sie ist ähnlich der des Colchicins: die Mitosen werden in der frühen Metaphase arretiert. Es handelt sich, ebenso wie beim Colchicin, um ein Spindelgift (LETTRE). Diese antimitotische Wirkung versuchte man zur Therapie maligner Tumoren auszunutzen.

Erste klinische Erfolge meldete HUBACHER 1959/60. Über weitere berichteten 1964 und 1965 BÜRGI, ECKMANN, GÜTTERS und HECKMANN. Jedoch konnten OSSWALD und SCHMÄHL mit der Proresid-Therapie bei Mäusen mit chemosensiblem Yoshida-Sarkom, Jensen-Sarkom, Walter-256-Ca und anderen Impftumoren keine Erfolge zeigen, während die alkylierenden Substanzen Endoxan und Trenimon in Abhängigkeit von der Konzentration erfolgreich waren.

GOLDENBERG und WITTE wiederum zeigten an Colontumorzellen, überimpft auf Hamsterbackenschleimhaut, einen eindeutigen zytostatischen Effekt durch Proresid ^{R}. Der umfassendste Bericht mit 5-Jahres-Resultaten erschien 1966 von HUBACHER.

II. Fragestellung

Alle Cytostatica haben eine hemmende Wirkung auf proliferationsfreudiges Gewebe, wie Blutbildungsorgane, Darmschleimhaut und Spermiogenese. Die klinischen Untersucher jedoch lobten als besonderen Vorzug des Proresid^{R} das Fehlen einer spürbaren Leukocytendepression. Darum interessierte die Reaktion des menschlichen Knochenmarks unter Einfluß von Proresid^{R}.

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, ob SP-I einen direkten Einfluß auf die Kinetik der Erythrocytopoese und Granulocytopoese des Menschen hat und ob dieser Einfluß auf einer spezifisch mitosehemmenden Wirkung beruht. Um eine metabolische oder hormonelle Beeinflussung des Organismus mit Rückwirkung auf das Knochenmark auszuschliessen, wurde Proresid^{R} dem Knochenmark in vitro zugesetzt.

III. Allgemeine Grundlagen

Im Knochenmark ist nach BOLL die Proliferation die Summe von Regeneration und Reifung. Dabei bilden die Zellteilungen (Mitosen) und das Zellwachstum (Interkinese) die Regeneration, ausgedrückt durch die Mitosehäufigkeit, gezählt als Mitoseindex MI. Sie wird berechnet nach folgender Formel:

$$MI = m \cdot t_m$$

Dabei bedeutet m die Mitosehäufigkeit, t_m die Mitosedauer und MI die Mitosen, gezählt aus den fixierten Präparaten, die während einer bestimmten Zeit bei den gezählten, teilungsfähigen Zellen der weißen oder roten Reihe aufgetreten sind.

Die Zellreifung (Differenzierung) kann durch die Reifungskurven nach BOLL bezeichnet werden. Damit stehen die beiden Faktoren zur Be-

stimmung der Proliferation fest und erlauben Aussagen über deren Aktivität.

Nach obiger Formel kann eine Erhöhung des Mitoseindex auf einer vermehrten Mitosehäufigkeit oder auf der durch Mitosehemmung hervorgerufenen Verlängerung der Mitosedauer beruhen (ASTALDI). Zur Unterscheidung bietet sich die Darstellung der prozentualen Mitosephasenverteilung, die caryologische Kurve (FIESCHI). Diese müßte eine Vermehrung der Metaphasen ergeben, um eine Hemmung des Mitoseablaufs durch die colchicinartige Wirkung des SP-I anzuzeigen. Dazu muß der Eintritt in die Mitose unbehindert sein, d.h. die vorherigen Phasen des Zellcyclus (Interphase oder Synthesephase nach LETTRE) müssen durchlaufen sein. Das verlangt: 1. SP-I darf nicht, wie die alkylierenden Substanzen, in die Interphase eingreifen und damit das Wachstum der Zelle bzw. die DNS Reduplikation verhindern; 2. das Gewebe muß teilungsfreudig sein, um das Mitosegift zur Wirkung kommen zu lassen.

IV. Material und Methoden

A) Anfertigung der Kulturen

Von den Sternalpunktaten von zwölf Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen wurden

1.) Ausstriche sofort nach der Punktion gemacht und nach PAPPENHEIM gefärbt.

2.) Kulturen angelegt, und zwar:
   a) Kontrollen ohne Zusatz
   b) mit verschiedenen SP-I-Zusätzen

Für die Knochenmarkkulturen wurde die Deckglasmethode nach CARELL, modifiziert von BOLL benutzt. Das Medium bestand aus:

40 % Nativ-Plasma des betreffenden Patienten
10 % Corhormon® der Firma Chemiewerk Homburg
50 % Hanks Lösung

Mit diesem Medium wurde diejenige Menge SP-I vermischt, die die gewünschte Konzentration ergab. Pro Arbeitsgang wurden nie mehr als 10 tr. verarbeitet. Davon wurde ein großer Tropfen auf einem Objektträger ausgebreitet, wo er nach wenigen Minuten ein Coagulum bildete. Auf dieses wurden mit Starmessern die Knochenmarkbröckchen gesetzt und diese wiederum mit einem kleinsten Tröpfchen Serum bedeckt. Ein Hohlschliffträger wurde darüber mit Vaseline befestigt, beides umgedreht, so daß Coagulum und Serumtröpfchen in die Rundung des Hohlschliffes hineinhängen. Mit Paraffin luftdicht verschlossen, wurden sie bei 37°C für 24^h und 48^h im Brutschrank inkubiert. Nach der genannten Bebrütungszeit wurden von allen Kulturen Ausstriche angefertigt und nach PAPPENHEIM gefärbt.

Es wurden

1) Kontrollkulturen angesetzt,
2) Kulturen mit folgenden SP-I-Konzentrationen: 0,0005 mg%
0,05 mg%
0,1 mg%
0,15 mg%
0,5 mg%
1,0 mg%
1,5 mg%

B) Zählung und Auswertung

Von den sofort angefertigten Ausstrichen und den Kulturen wurden

a) die Mitoseindices nach 24^h und 48^h gezählt.
Mitoseindex: Gesamtzahl aller gezählten teilungs-

fähigen Zellen im Verhältnis zu den gezählten Mitosen.
Teilungsfähige der roten Reihe: Proerythroblast bas., poly., oxy. Erythroblast.
Weiße Reihe: Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten, Jugendliche (Metamyelocyten)

b) die caryologischen Kurven aufgestellt. Sie bezeichnen die prozentuale Verteilung der Mitosephasen.

c) die Reifungskurven bis 48^{h} aufgestellt. Dabei wurde die rote und weiße Reihe getrennt dargestellt. Ausstriche der Koagulumkulturen lassen nur relative Verschiebungen der Zellarten feststellen.

Pro Präparat wurden 1000 Zellen gezählt, ausschließlich in den Randgebieten, da dort die Zellen gelockerter liegen und eine Ausdifferenzierung der Erythrocytopoese und Granulocytopoese sicherer ist. Dabei wurde das Gesichtsfeld, in großen Schleifen vom äußeren Rand beginnend, verändert. Insgesamt wurden 60 000 rote und weiße Zellen und 9 000 lymphatische (Reticulumzellen, Plasmazellen, Megacaryocyten, Lymphocyten) gezählt.

C) Beschreibung der gezählten Zellen des erythrocyto- und granulocytopoetischen Systems

Die erythrocytopoetische Reihe:

Proerythroblast
basophiler Erythroblast
oxyphiler Erythroblast
polychromatischer Erythroblast
reifer Erythrocyt

Sie wurde wie folgt differenziert:
Proerythroblast: Jüngster Vertreter der roten Reihe.

Mit 15 - 22 μ Durchmesser eine der größten und auffälligsten Zellen im Knochenmark. Sein Kern ist groß, rund, schwarzbraun mit feingekörntem Chromatinnetz und gleichmäßig mit einem basophilen Cytoplasmasaum umgeben.

Basophiler Erythroblast: 8 - 15 μ Durchmesser. Bei ihm beginnt sich die Kern-Plasmarelation zugunsten des stark basophilen Cytoplasmas zu verschieben. Der Kern ist grobschollig strukturiert.

Polychromatischer Erythroplast: 8 - 12 μ Durchmesser. Sein Kern zeigt eine charakteristische Radspeichenstruktur. Das Cytoplasma beginnt Hämoglobin einzulagern: seine Farbe wechselt daher von schiefrig-grau bis blaß-rosé.

Oxyphiler Erythroblast: 7 - 10 μ Durchmesser. Sein Cytoplasma hat sich schon vollständig mit Hämoglobin beladen. Es trägt die Farbe des reifen Erythrocyten. Der Kern zeigt grob-scholliges Chromatin, in Radspeichenstruktur angeordnet. Bei Verklumpung leitet es über zum

Reifen Erythroblasten: 7 - 10 μ Durchmesser. Sein Kern ist pyknotisch, oft exzentrisch gelagert. Das Cytoplasma zeigt meist die Farbe des Erythrocyten.

Die granulocytopoetische Reihe:

Myeloblast
Promyelocyt
Myelocyt (neutrophil)
Jugendlicher
Stabkerniger
Segmentkerniger

Sie wurde wie folgt differenziert:
Myeloblast: Sein Durchmesser beträgt 12 - 20 μ . Er kommt normalerweise nur bis zu 3 % im Knochenmark vor (BOLL). Sein Kern ist

von einem blaß basophilen Cytoplasmasaum umgeben, der keine azurophile Granulation zeigt. Ähnlich dem Proerythroblasten ist die Kern-Plasmarelation zugunsten des Kerns verschoben. Er besitzt feine Vakuolen, die im Farbton vom Kernchromatin kaum zu unterscheiden sind.

Promyelocyt: 16 - 27 μ Durchmesser. Er ist die größte Zelle der Granulocytopoese. Das Cytoplasma ist zu einem weiteren Ring um den Kern gelagert und trägt eine ins Auge springende azurophile Granula. Perinucleär sind Aufhellungen zu erkennen. Der Kern ist bohnenförmig bis oval.

Myelocyt (neutrophil): 12 - 18 μ Durchmesser. Der Kern ist rund oder oval. Das Cytoplasma, nicht mehr basophil, hat die azurophile Granula verloren.

Jugendlicher: 14 - 18 μ Durchmesser. Sein Cytoplasma ist grau, farblos. Der Kern buchtet sich stark ein, oft auch nierenförmig. Seine Struktur ist grobschollig.

Stabkerniger: 14 - 18 μ Durchmesser. Sein Cytoplasma gleicht dem des Jugendlichen. Der Kern ist dichter in der Struktur und wurstförmig im Halbkreis oder S-Form gebogen.

Segmentkerniger: 10 - 15 μ Durchmesser. Der Zelleib ist rund und zeigt blaßgräuliches Cytoplasma. 3 - 4 Fadenbrücken verbinden die einzelnen Kernteile. Eosinophile Myelocyten und auch eosinophile segmentkernige Granulocyten sind durch ihre grobe, Kern als auch Cytoplasma bedeckende Granula, sehr auffällig. Die eos. segmentk. Granulocyten besitzen außerdem meist nur zwei Segmente (wie PELGER Formen).

D) Differenzierung der Mitosephasen

An den Mitosen wurde folgende Differenzierung der einzelnen Phasen

nach BOLL vorgenommen:

1.) Prophase: Die Kernmembran ist aufgelöst, keine Nucleolen.

2.) Frühe Metaphase: Die Chromosomen sind wurmförmig aufgequollen. Sie beginnen den gesamten Zellkern auszufüllen und bilden ein lockeres Spirem.

3.) Späte Metaphase: Die Chromosomen sind verdoppelt und bilden die Äquatorialplatte bzw. einen Monaster.

4.) Anaphase: Die Chromosomen sind gewandert entlang der Spindel zu den Polen. Sie bilden einen Diaster.

5.) Telophase: Die Chromosomen sind geordnet an den Polen zu zwei lockeren Spiremen. Das Bild zeigt ein Dispirem. Das Zellplasma schnürt sich ein.

6.) Rekonstruktionsphase: Die beiden Tochterzellen liegen dicht beieinander ("Bruder u. Schwester Phänomen"). Ihre Chromosomen sind gefügt zu einem festen Spirem. Es beginnt sich die Kernmembran zu bilden.

E) Die Fälle

Pat.	Name	Alter	Diagnose d. Sternalpunktats
1	Fritz W.	60 J.	Monocytose
2	Marie L.	72 J.	Metast. Portio-Ca
3	Berta H.	81 J.	unbehandelter M. BIERMER
4	Minna D.	81 J.	chron. Infekt
5	Hildegard L.	63 J.	Normales Mark bei hoher BSG
6	Viktor B.	68 J.	Carcinose der Lunge
7	Christa K.	38 J.	akuter Myeloblastenschub einer chronischen Myelose
8	Emilie K.	89 J.	Verdacht auf maligne Retikulose
9	Fritz P.	56 J.	Carcinose der Lunge
10	Klara S.	70 J.	Aplastische Anaemie
11	Max M.	63 J.	Aplastische Anaemie
12	Martha R.	54 J.	akuter Infekt

V. Ergebnisse

A) Das Verhalten der Mitose Indices

Die ermittelten MI wurden als Funktion der Zeit auf Kurven eingetragen. Alle Punkte der Kontrollkurven liegen auf der Nullordinate. Es werden die Durchschnitts-MI der mit der jeweiligen SP-I Konzentration behandelten Knochenmarkskulturen eingezeichnet. Dabei wurden drei Gruppen von Konzentrationen eingeteilt:

1. geringste Konzentration 0,0005 mg%, dazu gehörten die Patienten 1, 3, 5, 6.
2. Mittlere Konzentration 0,05 - 0,5 mg%. Dazu als Untergruppen 0,05; 0,1; 0,15 und 0,5 mg% und die Patienten 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10.
3. Hohe Konzentration 1,0 und 1,5 mg% mit den Patienten 7, 8, 11, 12.

Zu 1.)
Für die SP-I Konzentration von 0,0005 mg% wurden die KM-Kulturen von vier Patienten ausgewertet. Es ergab sich eine Durchschnittssenkung des MI der Erythrocytopoese nach 24^h um 4,65 °/oo und nach 48^h um 11,25 °/oo (Abb. 1). Auch in der Granulocytopoese senkte sich der MI nach 24^h um 6,48 ‰ und nach 48^h um 3,11 °/oo unter den Wert der Kontroll-M (Abb. 2).

Zu 2.)
Diese Gruppe verhält sich untereinander gleichwertig. Nach 24^h sind in der Erythrocytopoese alle MI über die Werte der Kontroll-MI im Mittel um 6,06 °/oo erhöht, am geringsten bei der Konzentration von 0,05 mg% (um 0,50 °/oo), und am höchsten bei der von 0,15 mg% (um 12,60 °/oo). Die in dieser Gruppe höchste Konzentration 0,5 mg% (für sie wurden die KM von vier Patienten ausgewertet) erreichte nur eine Erhöhung von 4,25 °/oo über den Kontrollwert. - Nach 48^h senken sich die MIs der gesamten Gruppe auf die Werte der Kontrollkurve.

In der Granulocytopoese zeigen die vier aufgeführten SP-I Konzentrationen als Ganzes ebenfalls gleiches Verhalten. Nach 24^h fallen die MI-Werte unter die der Kontrollen. Am stärksten bei der Konzentration von 0,05 mg%, nämlich um 6,67 °/oo, und am geringsten bei der Konzentration von 0,5 mg%, nämlich um 1,62 °/oo. - Nach 48^h nähern sie sich wieder den Werten der Kontroll-MIs.

Zu 3.)
Diese Gruppe, bei der die KM-Kulturen von vier Patienten ausgewertet wurden, zeigt in der Erythrocytopoese einen Anstieg der MIs bei einer Konzentration von 1,0 mg% von 18,25 °/oo und bei der Konzentration 1,5 mg% von 24,96 °/oo, im Mittelwert 21,6 °/oo über die 24^h-Werte der Kontroll-MIs.

In der Granulocytopoese fallen die MIs unter die Werte der Kontrollen nach 24^h. Bei 1,0 mg% um 3,52 °/oo und bei 1,5 mg% 9,03 °/oo,

im Mittelwert um 6,28 °/oo. Die Knochenmarkskulturen nach 48^{h} wurden wegen der aufgetretenen Zellzerstörungen nicht ausgewertet. Die Unterschiede in den Mitoseindices zwischen Kontrollen und SP-I-Zusätzen sind in der t-Verteilung nach STUDENT nicht signifikant.

MITOSE-INDICES

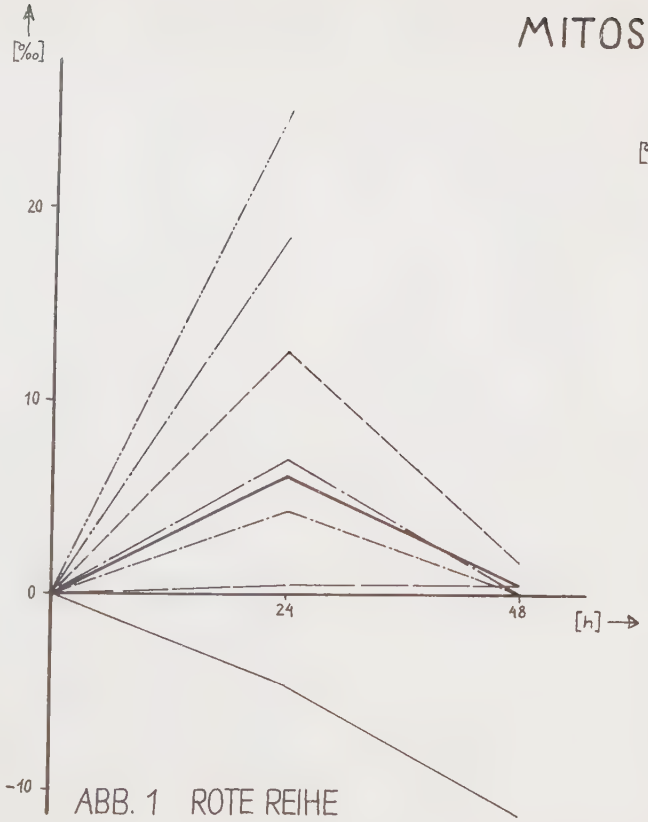


ABB. 1 ROTE REIHE

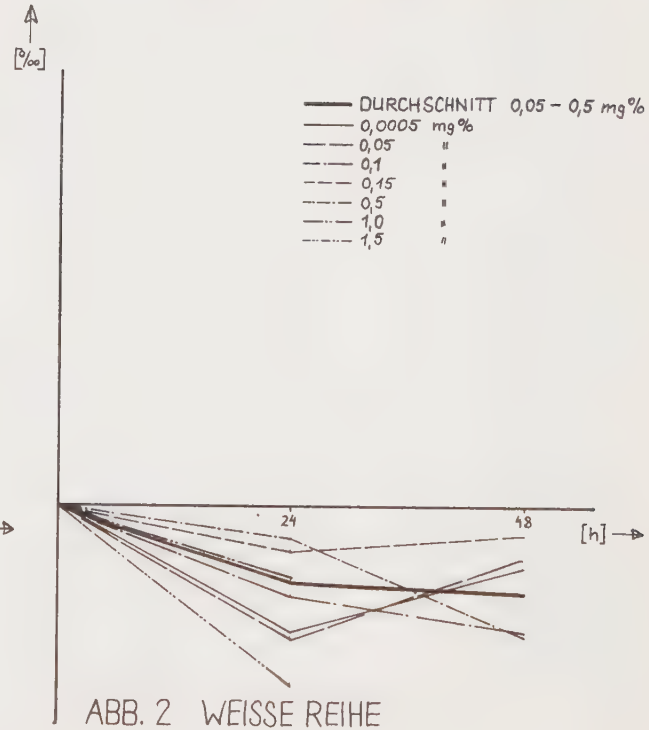


ABB. 2 WEISSE REIHE

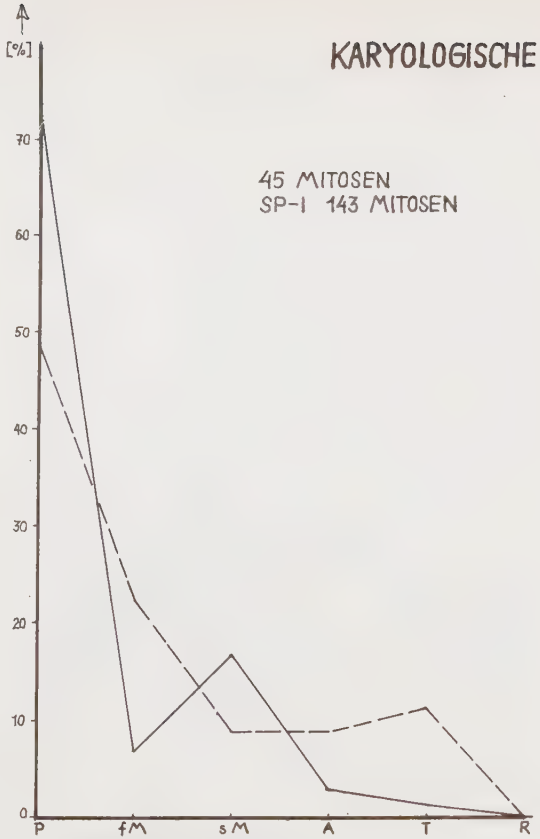
B) Die Karyologischen Kurven

Die Karyologischen Kurven zeigen die Mitosestufen auf der Ordinate und die Prozentverteilung auf der Abszisse. Sie wurden aus sämtlichen Gruppen von SP-I-Konzentrationen aufgestellt. Eine Auswertung der einzelnen Konzentrationen war wegen der geringen Anzahl an Mitosen unmöglich.

Von 143 gezählten Mitosen der Erythrocytopoese unter SP-I-Einwirkung (Abb. 3) fielen 72,0 % auf die Prophasen, 7 % auf die frühen Metaphasen. Zu den späten Metaphasen klettert die Kurve minimal auf 16,7 %, um über die Anaphasen mit 2,7 % zu den Telophasen mit 1,3 % abzufallen. Die Kontrollkurve der Erythrop. ohne SP-I-Zusatz beginnt mit einem geringeren Anteil an Prophasen: 48,9 %. Sie fällt dann weiter über die frühen Metaphasen (22,2 %) bis zu den späten Metaphasen (8,9 %), bleibt auch in den Anaphasen auf diesem Niveau und steigt mit den Telophasen auf 11,1 % an. Sie zeigt bei sehr kleinem Zahlenmaterial, im Gegensatz zu den SP-I-Werten, mehr Endphasen.

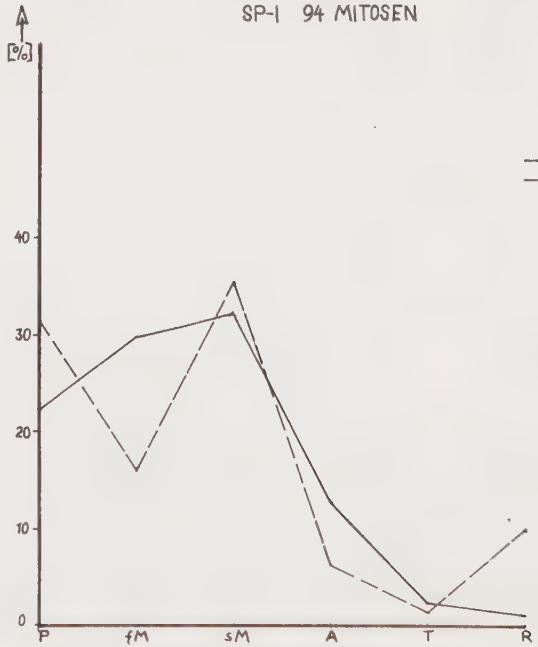
In der Granulocytopoese sämtlicher Kulturen mit SP-I-Zusätzen wurden 94 Mitosen gezählt (Abb. 4). Die Kurve beginnt bei 22,3 % Prophasen. Sie steigt an auf 29,8 % fM und weiter auf 32 % sM. Die Anaphasen sind mit 12,0 % und die Telophasen mit 2,7 % vertreten. Die Kontrollkurve mit 32 gezählten Mitosen zeigt einen etwas höheren Anteil an Prophasen (31,5 %) und einen Abfall in den fM (15,9 %). Zu den späten Metaphasen steigt sie wieder an auf 35,4 % und zeigt damit einen deutlichen Gipfel. Die Anaphasen erreicht sie bei 6,1 %, um dann noch weiterzufallen auf die Telophasen, die mit 1,3 % vertreten sind. In den Rekonstruktionsphasen steigt sie an auf 9,8 %.

KARYOLOGISCHE KURVEN SÄMTLICHER SP-I KONZENTRATIONEN



45 MITOSEN
SP-I 143 MITOSEN

ABB. 3 ROTE REIHE



82 MITOSEN
SP-I 94 MITOSEN

SP-I ZUSATZ
KONTROLLE

ABB. 4 WEISSE REIHE

C) Die Reifungskurven

Die Reifungskurven zeigen in Prozenten die Entwicklung der Differentialverteilung bei den einzelnen Zellarten des erythrocyto- und granulocytopoetischen Systems. Dabei ist die Gesamtheit der gezählten Zellen des jeweiligen Systems 100 %.

Für die oben angeführten Gruppen wurden mittlere Reifungskurven angefertigt, ebenso von den Kontrollen und den jeweiligen Zusätzen von SP-I.

Es zeigte sich:

In der Gruppe 1 (0,0005 mg% SP-I / mit den Patienten 3, 5, 6) (Abb. 5) gegenüber den Kontrollen eine Vermehrung der polychromatischen Erythroblasten nach 24^h und 48^h. In der granulocytopoetischen Reihe (Abb. 6) der gleichen Gruppe findet sich dagegen kein Unterschied in der Ausreifung zwischen Kontrollen und SP-I-Zusätzen.

In der Gruppe 2 (0,05 - 0,5 mg% SP-I / Patienten 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10) besteht in beiden Reihen (Abb. 7 u. 8) kein Unterschied zwischen Kontrollen und SP-I-Zusätzen.

In der Gruppe 3 (1,0 und 1,5 mg% / Patienten 8, 11), die nur bis 24^h ausgewertet werden konnte, findet sich in der erythropoet. Reihe kein Unterschied zwischen Kontrollen und SP-I-Zusätzen (Abb. 9), während in der granulocytopoet. Reihe (Abb. 10) sich bei 24^h eine Vermehrung der Myelocyten nach SP-I-Zusatz um 35 % gegenüber den Kontrollen zeigt.

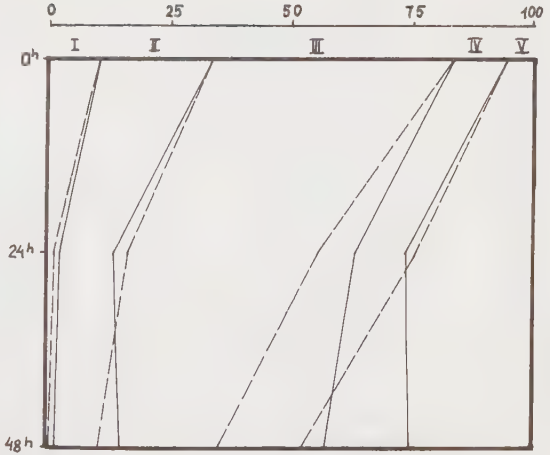
MITTLERE REIFUNGSKURVEN

SP–1 0,0005 mg%

PATIENTENGRUPPE 1

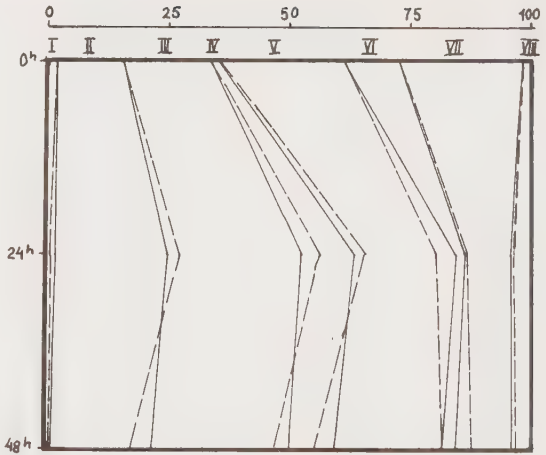
—— SP-1 ZUSATZ

– – – KONTROLLE



I PROERYTHROBLAST
II BASOPHILER ERYTHROBLAST
III POLYCHROM. ERYTHROBLAST
IV OXYPHILER ERYTHROBLAST
V REIFER ERYTHROCYT

ABB. 5 ROTE REIHE



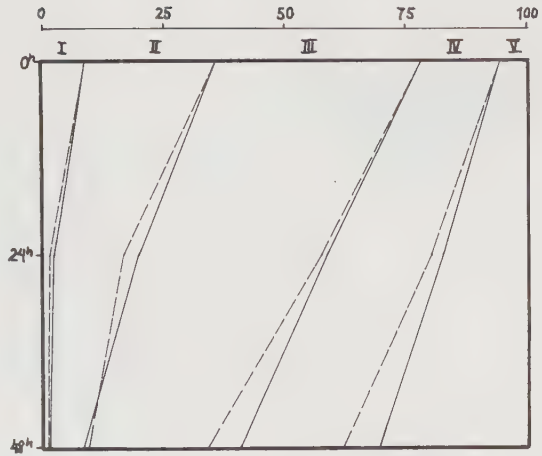
I MYELOBLAST
II PROMYELOCYT
III MYELOCYT
IV EOSINOPHILER MYELOCYT
V JUGENDLICHER
VI STABKERNIGER
VII SEGMENTKERNIGER
VIII EOSINOPHILER SEGMENTK.

ABB. 6 WEISSE REIHE

MITTLERE REIFUNGSKURVEN

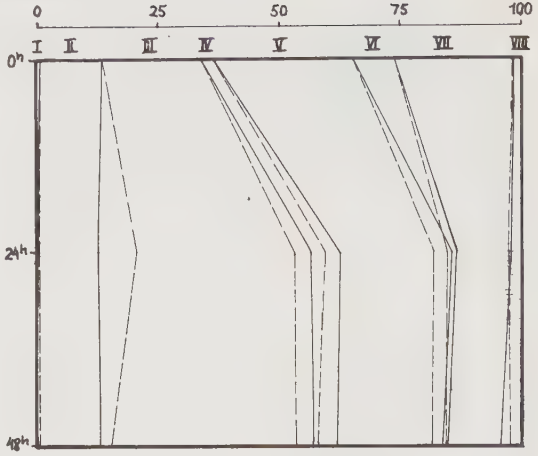
SP-I 0,05 – 0,5 mg%
PATIENTENGRUPPE 2

——— SP-I ZUSATZ
– – – KONTROLLE



I PROERYTHROBLAST
II BASOPHILER ERYTHROBLAST
III POLYCHROM. ERYTHROBLAST
IV OXYPHILER ERYTHROBLAST
V REIFER ERYTHROCYT

ABB. 7 ROTE REIHE



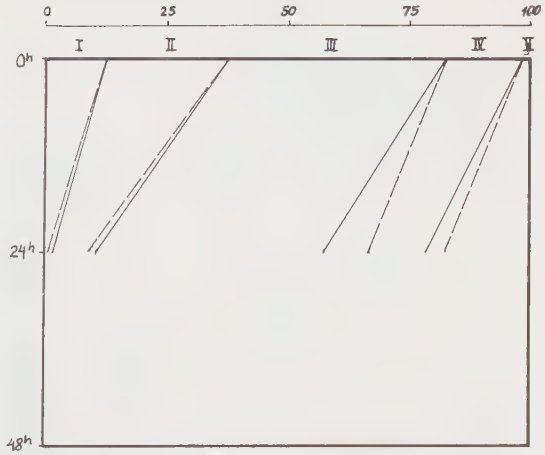
I MYELOBLAST
II PROMYELOCYT
III MYELOCYT
IV EOSINOPHILER MYELOCYT
V JUGENDLICHER
VI STABKERNIGER
VII SEGMENTKERNIGER
VIII EOSINOPHILER SEGMENTK.

ABB. 8 WEISSE REIHE

MITTLERE REIFUNGSKURVEN

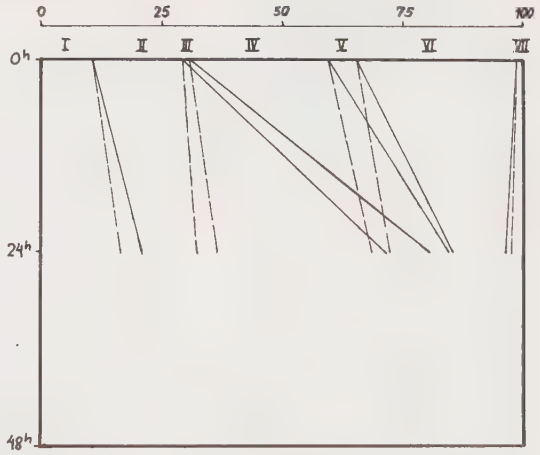
SP-1 1,0 + 1,5 mg %
PATIENTENGRUPPE 3

——— SP-1 ZUSATZ
– – – KONTROLLE



I PROERYTHROBLAST
II BASOPHILER ERYTHROBLAST
III POLYCHROM. ERYTHROBLAST
IV OXYPHILER ERYTHROBLAST
V REIFER ERYTHROCYT

ABB. 9 ROTE REIHE



I PROMYELOCYT
II MYELOCYT
III EOSINOPHILER MYELOCYT
IV JUGENDLICHER
V STABKERNIGER
VI SEGMENTKERNIGER
VII EOSINOPHILER SEGMENTK.

ABB. 10 WEISSE REIHE

VI. Zusammenfassung der Ergebnisse

In Gruppe 1 (SP-I 0,0005 mg%) ist der durchschnittliche Mitoseindex der Erythrocytopoese nach 24^h und nach 48^h gegenüber den Kontrollen erniedrigt. In der Karyologischen Kurve, die wegen zu geringer Mitosezahl nicht dargestellt ist, sind die späten Metaphasen erhöht, während die Reifungskurve eine Vermehrung der teilungsfähigen polychromatischen Erythrozyten zeigt. - Die Granulocytopoese-Reihe zeigt in dieser Gruppe gegenüber der Kontrolle ebenfalls eine Erniedrigung der durchschnittlichen Mitoseindices nach 24^h, die nach 48^h jedoch nicht mehr auffällig ist. Wie in der Erythrocytopoese sind trotzdem in der Karyologischen Kurve die späten Metaphasen um 28 % gegenüber der Kontrollkurve vermehrt. Die Reifungskurve der weißen Reihe ist gegenüber der Kontrolle nicht verändert.

In Gruppe 2 (SP-I 0,05 - 0,5 mg%) sind die durchschnittlichen Mitoseindices der roten Reihe nach 24^h gegenüber den Kontrollen erhöht und nähern sich nach 48^h den Kontrollwerten. In der Karyologischen Reihe sind ebenfalls die Prophasen um 23,4 % und die späten Metaphasen um 8,1 % gegenüber der Kontrollkurve erhöht. Die Reifungskurve der roten Reihe zeigt keine Veränderung der Zelldifferenzierung nach SP-I-Zusatz. - In der weißen Reihe der Gruppe 2 ist der durchschnittliche Mitoseindex nach 24^h und nach 48^h gegenüber den Kontrollen erniedrigt. In der Karyologischen Kurve sind die frühen Metaphasen um 22,6 % gegenüber den Kontrollen erhöht. Eine Veränderung der Zelldifferenzierung ist in der Reifungskurve im Vergleich zu den Kontrollwerten nicht feststellbar.

In Gruppe 3 (SP-I 1,0 - 1,5 mg%, nur 24^h-Werte) liegen die durchschnittlichen Mitoseindices der roten Reihe bei 24^h über den Kontrollwerten. In der Karyologischen Kurve, nicht dargestellt, weil sie mit der Abb. 3 und 4 zusammenfällt, sind die Prophasen um 26,1 % und die späten Metaphasen um 5,8 % gegenüber der Kontrollkurve erhöht.

Die Reifungskurve der roten Reihe dieser Gruppe zeigt keine Veränderung der Zelldifferenzierung nach SP-I-Zusatz. - Die weiße Reihe der Gruppe 3 zeigt eine Erniedrigung der durchschnittlichen Mitoseindices nach 24^h gegenüber den Kontrollen. Die Karyologische Kurve ist gegenüber den Kontrollen in der frühen Metaphase um 10,9 % erhöht. Eine Veränderung der Zelldifferenzierung ist in der Reifungskurve bei den Myelocyten feststellbar, die gegenüber dem Kontrollwert um 30 % erhöht sind.

VII. Diskussion der Ergebnisse

Werden die oben aufgezählten Ergebnisse in die Formel

$$MI = m \cdot t_m$$

eingesetzt, berechnet man damit die Regeneration. Diese, summiert mit der aus den Reifungskurven beurteilten Reifung, ergibt für die Proliferation der Erythrocytopoese folgendes:

a) In der Gruppe 1 (SP-I 0,0005 mg%)
ist MI: erniedrigt
t_m: nicht verändert (keine Mitosehemmung nach der Karyologischen Kurve)

daraus folgt für die Regeneration
m: erniedrigt
Reifung: Reifungshemmung in der Reifungskurve

Das ergibt für die Proliferation: Hemmung der Proliferationskinetik durch verminderte Regeneration und Reifungshemmung.

b) In der Gruppe 2 (SP-I 0,05 - 0,5 mg%)
ist MI: wenig, aber nicht signifikant erhöht
t_m: nicht verändert (keine Mitosehemmung nach der Karyologischen Kurve)

daraus folgt für die Regeneration

m: erhöht

Reifung: keine Veränderung in der Reifungskurve

Das ergibt für die Proliferation: Geringe Verstärkung der Proliferationskinetik durch erhöhte Regeneration

c) In der Gruppe 3 (SP-I 1,0 - 1,5 mg%)

ist MI: erhöht

t_m: verlängert (leichte Mitosehemmung nach der Karyologischen Kurve)

daraus folgt für die Regeneration

m: gebremst

Reifung: keine Veränderung in der Reifungskurve

Das ergibt für die Proliferation: Proliferationskinetik durch gehemmte Regeneration beeinträchtigt

Für die Granulocytopoese ergibt sich bei gleichem Vorgehen folgendes:

a) In der Gruppe 1 (SP-I 0,0005 mg%)

ist MI: erniedrigt

t_m: nicht verändert (keine Mitosehemmung nach der Karyologischen Kurve)

daraus folgt für die Regeneration

m: erniedrigt

Reifung: keine Veränderung in der Reifungskurve

Das ergibt für die Proliferation: Hemmung der Proliferationskinetik durch verminderte Regeneration

b) In der Gruppe 2 (SP-I 0,05 - 0,5 mg%)

ist MI: erniedrigt

t_m: nicht verändert (keine Mitosehemmung nach der Karyologischen Kurve)

daraus folgt für die Regeneration

m: erniedrigt

Reifung: keine Hemmung in der Reifungskurve

Das ergibt für die Proliferation: Hemmung der Proliferationskinetik durch verminderte Regeneration

c) In der Gruppe 3 (SP-I 1,0 - 1,5 mg%)

ist MI: erniedrigt

t_m: nicht verändert (keine Mitosehemmung nach der Karyologischen Kurve)

daraus folgt für die Regeneration

m: erniedrigt

Reifung: Hemmung der Reifungskurve

Das ergibt für die Proliferation: Hemmung der Proliferationskinetik durch verminderte Regeneration und Reifungshemmung.

Dies zeigt zusammengefaßt: Geringe Konzentrationen (um 10^{-4} mg%) wirken proliferationshemmend auf die Erythrocytopoese durch Hemmung von Regeneration und Reifung. Hohe Konzentrationen (um 1 mg%) wirken hemmend auf die Proliferationskinetik der Granulocytopoese durch Hemmung von Regeneration und Reifung, während die Erythrocytopoese eine gewisse Mitoseblockierung zeigt. Zwischen diesen extremen Werten kommt es in der Erythrocytopoese zu einer geringen Proliferationserhöhung durch vermehrte Regeneration und in der Granulocytopoese zu einer geringen Proliferationshemmung durch verringerte Regeneration. Die beiden Reihen des hämopoetischen Systems verhalten sich demnach unter SP-I-Zusatz, in Abhängigkeit von den Konzentrationen, entgegengesetzt.

Die von STÄHELIN und HECKMANN experimentell am Tier und durch Krebs-Chemotherapie-Resistenztest gefundenen Werte wirksamer SP-I-Konzentrationen bewegen sich bei 0,0007 mg% bzw. 0,0005 mg%. Auch die klinischen Untersucher ECKMANN, GRÜTTERS, HUBACHER, SATTLER, SCHÄRTL und SIEMON erreichen diese Konzentrationen.

Sie zeigen Erfolge bei der Gabe von 100 - 2000 mg/Patient/Tag auf, die einer Konzentration von 10^{-5} - 10^{-4} entspricht. LARSEN et al. geben als Toleranzdosis für die Dauertherapie 3 - 10 mg/kg/Tag an und bleiben damit ebenfalls im oben genannten Konzentrationsbereich. Alle diese Werte bewegen sich in der Konzentration unserer Gruppe 1. Es müßte also in der klinischen Untersuchung eine Proliferationshemmung der Erythrocytopoese aufgetreten sein. Diese wird nicht berichtet.

Folgende Gründe sind dafür denkbar:

1. Durch lange Lebensdauer der Erythrocyten tritt eine Hemmung der Erythrocytopoese in der klinischen Untersuchung nicht deutlich hervor.

2. SP-I erreicht bei dieser Konzentration im Knochenmark in vivo keinen cytostatisch wirksamen Spiegel. MEIER-RUGE et al. zeigen bei Versuchen mit radioaktivmarkiertem SP-I und seiner Verteilung im menschlichen Organismus, daß die geringsten SP-I-Mengen im Knochenmark auftreten.

3. Kompensation der untergegangenen Zellen durch schnelleres Wachstum der restlichen Zellen, ein Mechanismus, den Tumorzellen nicht mehr besitzen.

Die Konzentrationen von 1 mg% SP-I und darüber wurden bisher nur in Tierversuchen angewandt (EMMENEGGER, STÄHELIN). Bei unseren Kulturen zeigten sie nach 48^{h} eine cytotoxische Wirkung. Für die Therapie von Tumoren des Menschen werden diese Konzentrationen nicht empfohlen, da der cytostatische Effekt schon bei geringeren Dosen auftritt (STÄHELIN, HECKMANN). Daraus erklärt sich das Fehlen einer Leukocytendepression im menschlichen Knochenmark bei allen klinischen Untersuchungen.

VIII. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird anhand von Kulturen aus menschlichem Knochenmark die Wirkung von SP-I (Proresid^{R}) auf die Proliferationskinetik der Erythrocyto- und Granulocytopoese gezeigt. SP-I wird in Konzentrationen von 10^{-4} mg% bis 1 mg% den Kulturen zugesetzt. Im Vergleich mit Kontrollkulturen ohne SP-I-Zusatz werden die Mitoseindices nach 24^{h} und 48^{h} gezählt, ihre prozentuale Verteilung in den Karyologischen Kurven gezeigt und die Zellreifung in mittleren Reifungskurven dargestellt. Aus diesen drei Parametern werden, getrennt für das erythrocytopoetische und das granulocytopoetische System, Aussagen über die Proliferation gemacht. Es wird gezeigt, daß die Konzentrationen von SP-I von 10^{-4} mg% eine Proliferationshemmung in der Erythrocytopoese und die von 1 mg% eine Proliferationshemmung in der Granulocytopoese und eine geringe Mitoseblockierung in der Erythrocytopoese ergeben. Diese Ergebnisse werden mit der Wirkung des SP-I bei der Behandlung von Tumoren des Menschen verglichen.

LITERATUR

(1) ASTALDI, G. et C. MAURI: La valutazione dell' attività proliferativa delle celle midollari. Studio di un "Test Statmocinetico", Haematologica 33:13 (1949)

(2) BOLL, I.: Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Berlin, Heidelberg, New York 1966

(3) BÜRGI, H., T. MEDICI: Kasuistischer Beitrag zur Behandlung maligner Tumoren unter SP-I-G. Praxis. Schweiz. Rundschau f. Medizin 53:886 (1964)

(4) CARELL, A. and A.H. EBELING: Pure Cultures of Large Mononuclear Leukocytes. J. Exp. Med. 36:365 (1922)

(5) ECKMANN, L.: Ergänzung der Krebsoperation durch Podophyllinderivate. Schweiz. med. Wschr. 94:1960 (1964)

(6) EMMENEGGER, H., H. STÄHELIN, J. RUTSCHMANN, J. RENZ, A. v. WARTBURG: Zur Chemie und Pharmakologie der Podophyllum-Glucoside und ihrer Derivate. Arzneimittel Forsch. 11:327-333, 459-469 (1961)

(7) GOLDENBERG, D.M. und S. WITTE: Die Wirkung von Proresid auf überpflanzte menschliche Tumoren des Darmtraktes. 2. Rothenburger Gespräch, 15. - 16. Juni 1966, Stuttgart 1967

(8) GRÜTTERS, L.: Vorläufige Erfahrungen bei der Behandlung maligner Tumoren mit den Zytostatika SP-G und SP-I. Hammer Symposium des Landesverbandes zur Krebsbekämpfung von Nordrh.-Westf., Hamm 1964

(9) HECKMANN, U.: Die Wirkung von Proresid auf weibliche Genitalkarzinome im Krebs-Chemotherapie-Resistenztest. 2. Rothenburger Gespräch, 15. - 16. Juni 1966, Stuttgart 1967

(10) HUBACHER, O.: Was leistet die zytostatische Zusatztherapie bei der Karzinombehandlung? (Unter Berücksichtigung der 5-Jahres-Resultate) 2. Rothenburger Gespräch, 15. - 16. Juni 1966, Stuttgart 1967

(11) LARSEN, V., J. BROCKNER, O. STORM: Methods of Application, dosage and tolerance of podophyllum antimitotics. In: Symposium sobre mitosis e inhibidores en la quimioterapia oncologica, Madrid, 5-6 Junio 1964, Madrid 1965

(12) LETTRE, H.: Eigenschaftsänderungen von Tumorzellen. Z. Krebsforsch. 59:568 (1953)

(13) LETTRE, H.: Spezifische Eigenschaften von Tumorzellen. Wien med. Wschr. 1958:791

(14) MEIER-RUGE, W., F. KALBERER, J. GRAUWILER: Die Verteilung des antimitotisch wirksamen Äthylhydrazids der Podophyllinsäure (SP-I) im Organismus sowie in malignen Tumoren des Menschen. Klin. Wschr. 42:1024 (1964)

(15) OSSWALD, H., D. SCHMÄHL: Untersuchungen mit Proresid (SP-I) bei verschiedenen Impftumoren. Med. Klinik 61: 681 (1966)

(16) SATTLER, A.: Vorläufiger Erfahrungsbericht über die zytostatische Malignombehandlung mittels SP-I und SP-G Sandoz. Krebsarzt 19:163 (1964)

(17) SCHÄRTL, W.: Interne Karzinombehandlung mit dem Zytostatikum Proresid^{R}. Vorläufige Mitteilung. Münchener Med. Wschr. 108:112 (1966)

(18) SIEMON, E.-P.: Erfahrungen mit zytostatischer Therapie mittels Podophyllinderivaten. 2. Rothenburger Gespräch, 15. - 16. Juni 1966, Stuttgart 1967

(19) STÄHELIN, H.: In: Symposium sobre mitosis e inhibidores en la quimioterapia oncologica, Madrid 1964

(20) STÄHELIN, H.: Einige experimentelle Befunde mit SP-I und SP-G Sandoz und ihre Bedeutung für die Klinik. 2. Rothenburger Gespräch, 15. - 16. Juni 1966, Stuttgart 1967

(21) STÄHELIN, H., A. CERLETTI: Experimentelle Ergebnisse mit den Podophyllum-Cytostatica SP-I und SP-G. Schweiz. Med. Wschr. 94:1490 (1964)

(22) SULLIVAN, B.J. und H.I. WECHSLER: In: Science 105:433 (1947)

Die geduldige Hilfe und wertvolle Erfahrung von Frau Privat-Dozentin Dr. med. I. Boll ermöglichte diese Arbeit.

Ich danke ihr.

Lebenslauf

Geboren am 29.11.1939 in Marburg/Lahn als ältester Sohn des Arztes Dr. med. Rudolf Lenzner und seiner Ehefrau Hermine, geb. Engels.

Den Krieg in Stettin, der Heimatstadt des Vaters, verbracht. 1945 Flucht über Doberan nach Rostock. Einschulung dort. 1947 Rückkehr nach Marburg, 1955 Umzug nach Lübeck. Februar 1959 Abitur dortselbst am humanistischen Gymnasium. Nach dem Abitur bis Herbst 1960 Wehrdienst.

Seit dem Wintersemester 1960/61 immatrikuliert an der Freien Universität Berlin und an deren Medizinischer Fakultät inskribiert. Physikum im Wintersemester 1963/64. Im Sommersemester 1965 Beginn der Arbeit an der hier vorgelegten Dissertation. Staatsexamen im September 1967. Seitdem als Medizinalassistent tätig.